

赵娜, 何晓旭, 贾磊, 等. 基于皮肤转录组的半滑舌鳎无眼侧黑化相关基因的筛选鉴定[J]. 海洋学报, 2022, 44(2): 57–66, doi:10.12284/hyxb2022044

Zhao Na, He Xiaoxu, Jia Lei, et al. Identification of genes related to blind side hypermelanosis of *Cynoglossus semilaevis* based on skin transcriptome sequencing[J]. Haiyang Xuebao, 2022, 44(2): 57–66, doi:10.12284/hyxb2022044

基于皮肤转录组的半滑舌鳎无眼侧黑化相关基因的筛选鉴定

赵娜^{1,3}, 何晓旭^{2,4}, 贾磊², 朱春华^{1*}, 张博^{1,2*}

(1. 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025; 2. 天津市水产研究所, 天津 300457; 3. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 4. 天津市农学院, 天津 300384)

摘要: 半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 作为比目鱼 (Pleuronectiformes) 中的代表物种, 是我国沿海地区重要的海水经济鱼类。半滑舌鳎体色异常的问题长期以来一直困扰着从业者。导致体色变化的原因多种多样, 遗传因素是最根本原因。针对半滑舌鳎无眼侧黑化的研究多在环境、营养、生理、常见色素基因克隆等方面展开, 新的功能基因挖掘工作欠缺。本研究选取半滑舌鳎不同体色皮肤进行转录组测序, 通过差异基因 GO 和 KEGG 富集比对分析, 在可能的 6 条黑色素相关的 KEGG 通路中筛查差异基因并对差异表达最为显著的 10 个基因进行了实时荧光定量聚合酶链式反应的验证。本研究找出了半滑舌鳎无眼侧黑化表达显著变化的 5 个功能基因, 分别为 *txndc*、*alox15b*、*ptgs2*、*ptgisPT-GIS*、*atp1a2a* ($p < 0.05$)。其中 *txndc*、*alox15b*、*ptgs2*、*ptgis* 基因在黑化组中表达水平高于对照组; 功能方面, 有 3 个基因均与花生四烯酸 (AA) 有一定的相关性, 这为多不饱和脂肪酸参与半滑舌鳎体色异常的分子调控机制提供了一定的理论支持。

关键词: 皮肤; 半滑舌鳎; 无眼侧黑化; 花生四烯酸; 转录组

中图分类号: S965.3

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2022)02-0057-10

1 引言

动物体色具有迷惑或躲避天敌等自我保护功能, 不同体色对鱼类的生存也有着特殊的意义。鱼类在生长发育过程中体色的变化主要受遗传因素的影响, 此外, 外部环境^[1-3]、饲料营养^[4]和神经内分泌物^[5-7]也会影响鱼类的体色变化^[8-9]。多数色素细胞的遗传是保守的^[10-11], 如一些与色素相关的基因先后在小鼠 (*Mus musculus*) 的皮肤和斑马鱼 (*Danio rerio*) 的皮肤

中均有发现, 而 *mitf*、*tyr*、*dct*、*sox10* 和 *ednr* 等^[12-15] 基因在皮肤中的生长发育表达特征也非常相似。此外, 在硬骨鱼中发现的 *slc24a5* 基因也参与哺乳动物体色或毛发中色素细胞的生长和发育^[16]。在鱼类体色生成过程中, 黑色素的产生和扩散起主导作用, 其中酪氨酸酶基因家族中的酪氨酸酶 (TYR) 是主效基因^[17]。TYR 受多个基因控制, 酪氨酸酶受体基因 1 (*tyr1*)、性别决定区 Y-box 10 基因 (*sox10*)^[18]、多巴胺异构酶基因 (*dct*)^[19]、黑皮质素受体-1 (*mc1r*) 对酪氨酸酶的产生

收稿日期: 2021-08-19; 修订日期: 2021-11-02。

基金项目: 天津市自然科学基金 (17JQNJC15000); 国家海水鱼产业技术体系项目 (CARS-47-Z01); 天津市水产产业技术体系项目 (ITFRS2017011)。

作者简介: 赵娜 (1984—), 女, 河北省保定市人, 副研究员, 博士, 研究方向为水生动物免疫及代谢调节。E-mail: penguinzn@163.com

* 通信作者: 张博, 副研究员, 博士, 研究方向为遗传育种与生物技术。E-mail: zb611273@163.com; 朱春华, 教授, 博士, 研究方向为水产养殖学。E-mail: hu860025@163.com

均具有调节作用^[20-22]。

研究表明, 饲养密度^[23]、水温^[24]、光照强度^[24]能显著地影响比目鱼(*Pleuronectiformes*)无眼侧黑化的发生。科学的养殖管理方法如营养成分的摄入控制和亲本筛选^[25]也能有效地减少比目鱼体色异常的发生。Nakamura 等^[26]认为, 缺乏光敏物质会导致黑色素合成不足, 如核黄素、类胡萝卜素、维生素 A 和维生素 D, 而核黄素被认为是其中最重要的因素。研究表明^[27], 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的白化病是视紫红质缺乏的结果, 其产生依赖于 DHA。而 Devresse 等^[28]认为, 色素沉着似乎与 DHA 无关, 而是与 DHA 和二十碳五烯酸的比例有关。胰蛋白酶、维甲酸相关酶、维甲酸受体及其结合受体(TR、VDR、PPAR 等)的突变及其对仔鱼色素细胞分化的调控, 可能影响鱼体两侧色素细胞的命运, 进而影响体细胞色素异常^[29-30]。不同环境背景色养殖实验中发现, 条斑星鲽(*Verasper moseri*)在浅色养殖环境下 *mch-R2* 的 mRNA 表达量低于黑色养殖环境, 但是两种环境中 *mch-R1* 的 mRNA 没有变化, 表明了 *mch-R2* 参与了不同环境背景下体色变化过程, *mch-R* 可能对黑色素聚集激素(MCH)有抑制调节作用^[31]。无眼侧黑化消退的牙鲆垂体 MCH mRNA 表达水平显著高于无眼侧黑化个体, 同时与无眼侧正常个体无显著差异, 表明了 MCH 及其基因均参与了无眼侧黑化消退的调控过程^[32]。在鱼类中, *tyr* 基因突变导致青鳉(*Oryzias latipes*)的黑色素细胞异常, 皮肤呈现橙色^[33]。虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)中的 *tyr* 基因突变显示嵌合白化(伪白化)和完全白化现象^[34]。黄颡(*Pelteobagrus fulvidraco*)的 *tyr* 基因突变则显示黑色素缺乏, 呈现体色部分白化^[35]。综上所述, 遗传和环境因素的相互作用影响了鱼类的体色异常。

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)的工厂化养殖过程中经常出现高比例体色异常的苗种, 即无眼侧出现黑色素的黑化现象^[36-37], 主要表现为无眼侧部分覆盖斑块色素, 有时甚至完全呈黑底, 不同的养殖环境会存在不同程度的黑化现象。体色异常极大地影响半滑舌鳎的销售价格, 长期困扰养殖企业, 却一直未能得到有效解决^[38]。针对半滑舌鳎无眼侧黑化, 影响体色变化的新基因有待挖掘和鉴定。转录组是目前研究基因表达的重要手段, 是筛选新功能基因的有效方法。本文选取半滑舌鳎体色异常皮肤样本和正常皮肤样本, 进行转录组测序的比较分析。以期找出与半滑舌鳎无眼侧黑化相关的表达显著变化的功能基因, 为半滑舌鳎体色异常的机制提供分子水平的理论支持。

2 材料和方法

2.1 鱼类取样准备

从天津乾海源水产养殖有限公司获得 3 尾无眼侧黑化的工厂化养殖半滑舌鳎, 平均体重为(0.61±0.02)kg, 平均体长为(28.2±0.1)cm。用浓度为 120 mg/L 的间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐(MS-222)(北京格林恒兴生物科技有限公司)将鱼麻醉后, 使用灭菌的手术剪和镊子剪开实验鱼的皮肤并采集样本, 获取无眼侧色素沉着的皮肤组织和非色素沉着的正常皮肤组织(图 1), 并在-80℃下保存, 直至提取 RNA。

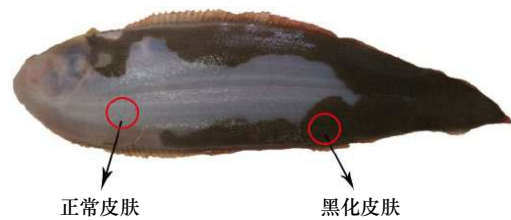


图 1 半滑舌鳎无眼侧黑化鱼体色特征
Fig. 1 The body color feature of the *Cynoglossus semilaevis* with no eye side blackened fish

2.2 RNA 测序、数据过滤及生物信息学分析

使用 Trizol 试剂(日本 Takara)提取总 RNA。安捷伦 2100 生物分析仪(安捷伦科技公司, 美国圣克拉拉)用于评估 RNA 质量和浓度。无眼侧黑化皮肤组织中的样品标记为 csc1、csc2 和 csc3; 正常皮肤样品标记为 csh1、csh2 和 csh3。测序平台为 Illumina HiSeq™ 2500(Illumina 公司, 圣地亚哥, 加利福尼亚州, 美国)。用带 Oligo(dT)的磁珠富集 mRNA, 再以片段化后的 mRNA 为模板, 用六碱基随机引物合成 cDNA 第一链, 并加入缓冲液、dNTPs(A、U、G、C)、核糖核酸酶 H 和 DNA 聚合酶 I 合成 cDNA 第二链; 再经过磁珠纯化并加 EB 缓冲液洗脱, 对洗脱之后的双链 cDNA 进行末端修复、加碱基 A、加测序接头处理, 然后用磁珠进行片段大小选择、降解含 U 链, 并进行 PCR 扩增, 从而完成整个文库制备工作。根据物种的参考基因组和基因信息(GCA_000523025.1), 将转录组测序所产生的数据比对到参考基因组上。获得过滤后数据后, 将其与参考基因组进行序列比对, 获取测得条目的定位信息。

2.3 差异表达分析和样品相关性分析

用 bowtie2 软件将过滤后数据比对到参考转录本序列, 而后利用 RSEM 软件, 调用 bowtie2 的比对结果进行统计, 得到每个样品比对到每个转录本上的测得条目数目, 并对其进行 FPKM 转换。FPKM 是指每百

万测得片段中来自某一基因平均每 1 000 碱基长度的测得片段数目,其同时考虑了测序深度和基因长度对测得片段计数的影响,是目前最为常用的基因表达水平估算方法。用 R 语言包 edgeR 进行差异分析,筛选阈值为错误发现率(False Discovery Rate, FDR)小于 0.05, \log_2FC (FC 为实验组与对照组可测量比值)大于 1 或 \log_2FC 小于 -1。利用皮尔森相关系数进行相关性分析,相关系数越接近 1,表明样品之间表达模式的相似度越高。相关性系数是介于 -1~1 之间的实数,当相关性系数介于 -1~0 时,表明变量之间存在负相关关系;当相关性系数介于 0~1 时,表明变量之间存在正相关关系;当相关性系数为 0 时,二者之间不存在相关性。

2.4 差异基因 GO 和 KEGG 富集及功能筛选

根据分析目的筛选出差异基因后,研究差异基因在 Gene Ontology(简称 GO, <http://www.geneontology.org/>)中的分布状况。KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)是有关通路的主要公共数据库。通路显著性富集分析以 KEGG 通路为单位,应用超几何检验,找出差异基因相对于所有有注释的基因显著富集的通路。GO 富集分析方法为 Hyper-geometric 分布,与 KEGG 富集分析方法一样,我们选取 $FDR \leq 0.05$ 的 GO 条目作为显著富集的 GO 条目。 $FDR \leq 0.05$ 的通路定义为在差异表达基因中显著富集的通路。我们挑选了富集最显著的 20 条通路,绘制差异表达基因 KEGG 富集散点图。KEGG 富集程度通过富集因子、 Q value 和富集到此通路上的基因个数来衡量。其中富集因子指该通路中富集到的差异基因个数与注释基因个数的比值。富集因子越大,表示富集的程度越大。 Q value 是做过多重假设检验校正之后的 P value, Q value 的取值范围为 0~1,越接近 0,表示富集越显著。差异基因功能筛选集中于比目鱼体色异常的相关 6 条代谢通路,这 6 条 KEGG 代谢通路如下:花生四烯酸代谢通路、甲状腺激素合成通路、光转导通路、黑色素生成通路、视黄醇代谢通路和 PPAR 信号通路。

2.5 候选基因的 qPCR 定量验证

用 qPCR 方法检测黑化鱼正常皮肤样本(csh1、csh2 和 csh3)和黑化皮肤样本(csc1、csc2 和 csc3)中的候选 mRNA 的表达。采用北京百奥创新科技有限公司核酸提取试剂盒和 PowerUp-SYBR-Green-Master-Mix 进行 mRNA 提取和 qPCR。在 42℃ 加热 2 min,在冰浴中孵育 2 min,加入提取 RNA 的试剂,在 42℃ 加

热 15 min,提取总 RNA,然后在 85℃ 下保持 5 min。将 RNA 储存在 -80℃ 下。cDNA 合成按照 PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒操作方法进行,cDNA 储存在 -20℃ 下备用。使用 QuantStudio6 Flex 实时 PCR 系统(美国加利福尼亚州赛默飞世尔科学公司)在 96 孔板中进行 qPCR,反应体积为 20 μ L: AceQ® qPCR SYBR® Green Master Mix (Without ROX) 10.0 μ L, Primer 1 (10 μ mol/L) 0.4 μ L, Primer 2 (10 μ mol/L) 0.4 μ L, cDNA 1.0 μ L, ddH₂O 8.2 μ L,配制过程在冰上完成。反应程序包括:50℃ 预热 2 min,95℃ 预热 2 min,随后在 95℃ 下,持续 30 s,58℃ 持续 30 s,95℃ 持续 15 s,进行 40 个循环。选择 β -肌动蛋白的表达水平作为正常化的内源性对照。每个样品设置 3 个技术重复,并使用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 方法计算 mRNA 的相对表达量。

3 结果

3.1 RNA-seq 数据披露

通过 RNA-seq,6 个样本共产生 416 464 144 个过滤后数据,平均数据量在 10 G 左右(9 208~11 897 M),Q20 和 Q30 分别在 92% 和 97% 左右。数据结果表明,6 个样品的测序质量良好,数据量充足,详细数据如表 1 所示,转录组数据已经上传至美国国立生物技术信息中心,数据获取编号为(PRJNA665385)。

表 1 6 个半滑舌鲷皮肤转录组测序样品过滤后数据产出及质控分析

Table 1 Clean reads output and quality control analysis of six *Cynoglossus semilaevis* skin transcriptome sequencing samples

样本名称	总有效读数	碱基数目	Q20质量分值	Q30质量分值	GC含量百分比/%	N碱基含量
csc1	65 031 072	9 725	97.03	92.20	47.68	0
csc2	73 612 170	10 981	96.83	91.93	48.19	0
csc3	66 089 004	9 886	96.95	91.96	48.81	0
csh1	79 487 970	11 897	97.25	92.55	47.61	0
csh2	70 698 406	10 579	97.31	92.72	48.38	0
csh3	61 545 522	9 208	97.02	92.04	48.22	0

对两组 6 个样品的 RNA-seq 的过滤后数据进行基因组比对统计,6 个样品的过滤后数据数量分布在 30 772 761~39 743 985 之间,唯一比对到参考基因组上的测得条目百分比分布在 76.47%~81.36% 之间,不能比对到参考基因组的测得条目数目(双端统计)普遍低于 20%(表 2)。以上结果进一步说明 6 个样品的转录组测序数据质量过关,可作进一步分析。

表 2 6 个半滑舌鲷皮肤转录组测序样品基因组比对统计表

Table 2 Genomic comparison statistics of six *Cynoglossus semilaevis* skin transcriptome sequencing samples

样品名称	总数目	唯一比对到参考基因组上的测得条目数目及占比	比对到参考基因组多处的测得条目数目及占比	不能比对到参考基因组的测得条目数目及占比
csh1	39 743 985	32 335 924(81.36%)	1 897 171(4.77%)	5 510 890(13.87%)
csc1	32 515 536	24 786 485(76.23%)	1 145 579(3.52%)	6 583 472(20.25%)
csh2	35 349 203	28 571 030(80.83%)	1 563 099(4.42%)	5 215 074(14.75%)
csc2	36 806 085	28 143 927(76.47%)	1 482 619(4.03%)	7 179 539(19.51%)
csc3	33 044 502	25 549 970(77.32%)	1 369 439(4.14%)	6 125 093(18.54%)
csh3	30 772 761	24 553 311(79.79%)	1 291 583(4.20%)	4 927 867(16.01%)

3.2 差异表达分析及样品相关性分析

csc1、csc2 和 csc3 样本之间的相关系数处于 0.97~1 之间, 接近 1, 表明变量之间存在正相关关系, 样品之间表达模式为强相关。csh1、csh2 和 csh3 样本之间的相关系数处于 0.76~1 之间, 表明变量之间存在正相关关系, 样品之间表达模式为强相关, 但是相关性弱于 csc 样本。csc1、csc2 和 csc3 样本和 csh1、csh2 和 csh3 样本的相关系数处于 0.18~0.45 之间, 表明变量之间存在正相关关系, 样品之间表达模式处于弱相关和中度相关(图 2)。

图 3a 显示, 样本无眼侧黑化皮肤 csc1、csc2、csc3 和无眼侧正常皮肤 csh1、csh2、csh3 之间差异基因总数 1 665 个, 其中上调基因 497 个, 下调基因 1 168 个。通过转录组测序得到黑化半滑舌鲷的无眼侧正常和无眼侧黑化皮肤的转录组序列信息, 对转录组数据分析共得到 837 540 个位点, 其中 A/G、C/G、C/T、G/A 之间转换数量最多。通过图 3b 也可以观察到, csc

与 csh 两组之间部分基因的表达量存在明显差异(图 3)。

3.3 差异表达基因的 GO 及 KEGG 富集分析及体色功能差异基因筛选

对无眼侧黑化组和无眼侧正常组皮肤进行 GO

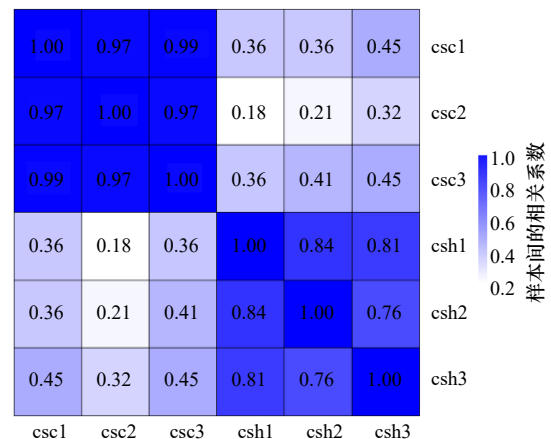


图 2 测序样品相关性分析热图

Fig. 2 Correlation analysis heat map of sequencing samples

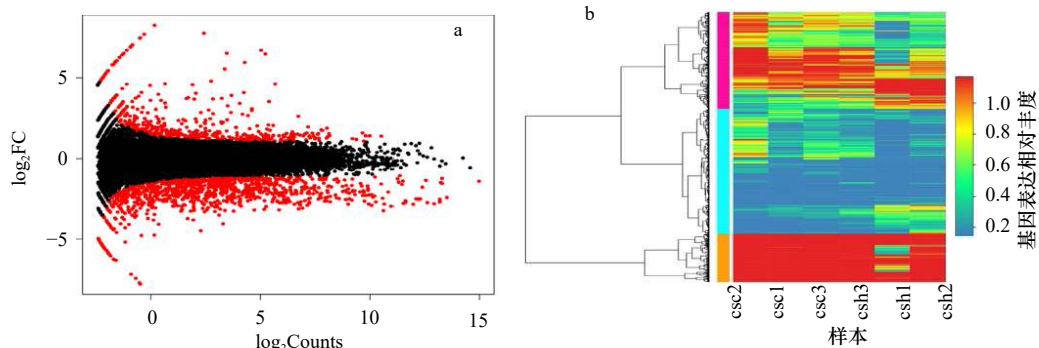


图 3 半滑舌鲷正常皮肤与黑化皮肤样品间差异表达基因火山图和差异表达基因丰度热图

Fig. 3 Volcano map of the number of differentially expressed genes and heat map of abundance of differentially expressed gene between normal and hypermelanotic skin samples of *Cynoglossus semilaevis*

a. 红色点代表差异基因, 黑色点代表被过滤掉的数据, Count 为测得计量数; b. 纵向代表基因类型

a. The red dots represent differential expressed genes, the black dots represent the filtered date, Counts is the measured quantity;

b. the vertical one represents genes

富集分析时发现,在生物过程水平上差异基因主要富集在细胞过程、信号组织过程、代谢过程、生物调控、生物学过程这5个GO通路;在细胞组份上主要富集在膜、细胞、细胞组份、膜组份、细胞器这5个GO通路;在细胞功能上主要富集在连接、催化活性

这2个GO通路(图4a)。由KEGG富集散点图(图4b)可见,无眼侧黑化和无眼侧正常皮肤表达差异显著的基因参与的通路主要有:丙酮酸代谢、C5-支链二元酸代谢、甲烷代谢、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成、半胱氨酸和蛋氨酸代谢物、果糖和甘露糖代谢、半乳糖代谢、Apelin信号通路、逆行内源性大麻素信号、心肌细胞中的肾上腺素能信号、碳代谢、氨基酸生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢、淀粉和蔗糖代谢、磷酸戊糖途径、糖酵解/糖异生、光合生物中的碳固定、钙信号通路、心肌收缩、氧化磷酸化

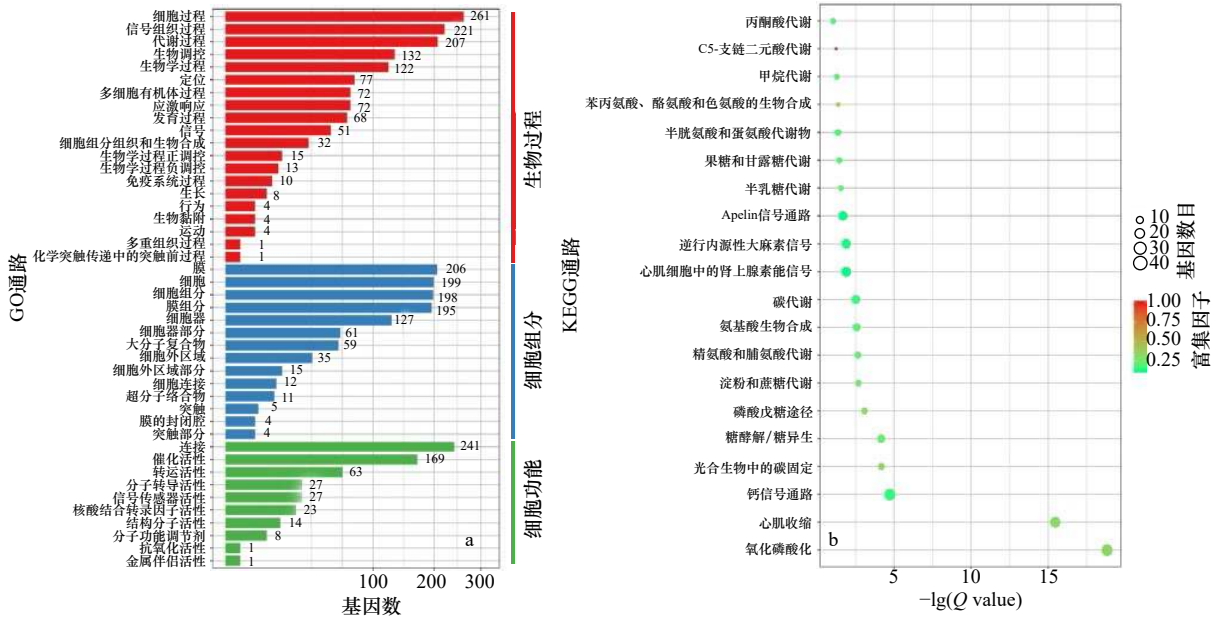


图4 半滑舌鳎正常与黑化皮肤转录组测序差异基因富集注释的GO通路和KEGG通路

Fig. 4 GO pathways and KEGG pathways analysis of differentially expressed genes enrichment annotations of transcriptome sequencing of normal and hypermelanotic skin of *Cynoglossus semilaevis*

3.4 定量PCR验证结果

从转录组富集结果中选取的6条KEGG代谢通路如下:花生四烯酸代谢通路、甲状腺激素合成通路、光转导通路、黑色素生成通路、视黄醇代谢通路和过氧化物酶体增殖物激活受体信号通路。在以上6条通路中选取差异最显著的前10个基因进行定量表达验证。对黑化半滑舌鳎皮肤中差异表达基因进行相对表达水平定量分析发现,黑化半滑舌鳎皮肤差异表达基因的表达趋势与RNA-seq定量结果一致,表明转录组测序结果可靠。针对6个测序样本,对6个候选体色相关mRNA定量qPCR表达检测结果绘制箱线图(图5)。其中5个基因 *txndc*、*alox15b*、*ptgs2*、*ptgis*、*atp1a2a*在两组样本中均有显著差异($p < 0.05$),且有4个基因在黑化组中表达均高于对照组,只有 *atp1a2a* 表达在黑化组表达较低,而 *acbd7* 基因则在两组中无显著差异($p > 0.05$)。

4 讨论

色素的异常沉着是比目鱼养殖过程中的一个主要问题,体色异常显著降低了比目鱼的市场价值^[39]。

近年来,关于半滑舌鳎体色异常的研究多有文献报道^[40-41],其主要集中于已知体色调控基因的表达模式、着色剂饲料增色效果、理化因子对体色的影响等^[42-43],而从组学角度挖掘半滑舌鳎体色调控新基因的研究则比较缺乏。本研究运用二代测序技术对黑化半滑舌鳎的皮肤转录组进行测序分析,得到了半滑舌鳎无眼侧黑化皮肤组织和非色素沉着的正常皮肤组织的转录组数据,从6条代谢通路(花生四烯酸代谢通路、甲状腺激素合成通路、光转导通路、黑色素生成通路、视黄醇代谢通路和过氧化物酶体增殖物激活受体信号通路)中筛选出半滑舌鳎体色异常相关的差异基因,为今后半滑舌鳎进行体色异常排查提供了参考。选取其中差异最显著的10个基因进行验证后发现,有5个差异基因与测序结果趋势相一致,分别为 *txndc*、*alox15b*、*ptgs2*、*ptgis*、*atp1a2a*,且前4个基因均在黑化组中上调,只有 *atp1a2a* 在黑化组中下调表达,暗示了这5个差异基因可能参与了无眼侧皮肤黑化的调控。

TXNDC是含硫氧还原蛋白,此基因编码内质网蛋白质的二硫键异构酶家族成员,该酶催化蛋白质折

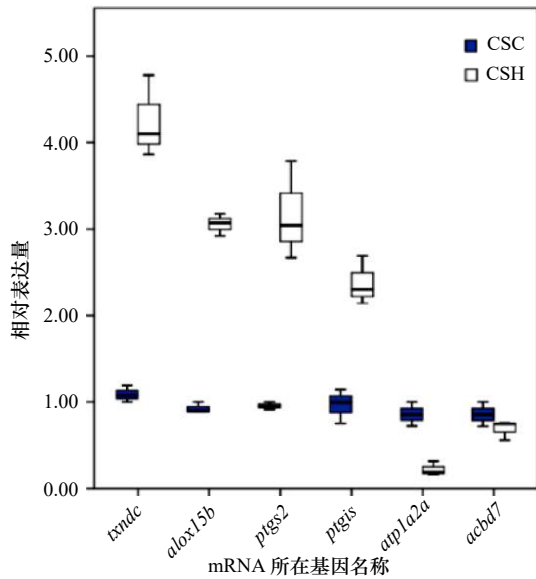


图 5 6 个候选体色相关 mRNA 在半滑舌鲷 6 个测序样品中的 qPCR 表达检测结果箱线图

Fig. 5 Box plot of qPCR expression results of 6 candidate body color-related mRNAs in 6 sequencing samples of *Cynoglossus semilaevis*

蓝色 CSC 代表半滑舌鲷皮肤正常对照组定量结果, 白色 CSH 代表半滑舌鲷皮肤黑化实验组相对表达结果

The CSC represents the relative expression in skin of normal *C. semilaevis* in the control group, and the CSH represents the relative expression in the skin of hypermelanotic *C. semilaevis* in the experimental group

叠和巯基-二硫键互换反应。硫氧还原蛋白 5(TXNDCS), 是近年发现的 PDI 家族成员之一, 具有抗凋亡、抗氧化损伤和促进细胞增殖、促进血管形成、参与细胞炎症、能量代谢等多种生物功能^[44-45]。ALOX15B 是花生四烯酸 15 脂氧合酶, 编码该酶的基因编码参与脂肪酸氢过氧化物生产的结构相关的非血红素铁双加氧酶的脂氧合酶家族成员, 其所编码的蛋白质仅将花生四烯酸转化为 15S-氢过氧二十碳四烯酸^[46-47]。PTGS2 是前列腺素内过氧化物合酶 2, 又称环加氧酶 2, 是花生四烯酸(AA)转化为前列腺素(PGs)的关键酶。在前列腺素合成初期起催化作用, 可将 AA 代谢成各种 PGs 类产物^[48], 这些 PGs 参与维持机体内多种生理过程, 是胚胎移植初期时胚胎和子宫信息交流的重要介质之一, 在调节发情周期、妊娠维持和分娩中起着关键作用^[49-50]。PTGIS 是前列环素合酶, 是细胞色素 P450(CYP450)超家族的 8 族(CYP8)成员, 也是 AA 的主要产物^[51]。研究发现, PTGIS 在许多生理和病理过程中起着重要作用, 该基因编码前列腺素 12 合酶, 并催化前列腺素 I₂(PGI₂)的合成^[52]。atp1a2

是 ATP 酶 A2 亚单位, 该基因编码的蛋白质属于 P 型阳离子, 转运 ATP 酶家族和 Na⁺/K⁺-ATP 酶亚家族^[53]。

这 5 个差异基因中有 3 个基因均与 AA 有一定的相关性, 即 ALOX15B 是 AA15 脂氧合酶, PTGS2 是 AA 转化为 PGs 的关键酶, PTGIS 是 AA 的主要产物。AA 是一种不饱和脂肪酸, 由磷脂酶 A2(Phospholipase A2, PLA2)催化而来, 可通过环氧合酶(Cyclooxygenase, COX)、脂氧合酶(Lipoxygenase, LOX)与 CYP450 途径生成多种代谢产物。在海水鱼类中, AA 主要在生长、存活、调节免疫、抗应激及繁育等方面发挥重要作用^[54-56]。目前, 关于 AA 在鱼类方面的研究主要集中在饲料中改变 AA 含量, 分析其对鱼类的生长性能、脂质代谢、脂肪酸营养、肠道组织、色素沉积等方面的影响。Sargent 等^[55]指出, 在比目鱼的开口饵料中添加一定量的 AA, 将对背部皮肤色素沉积产生较大影响。Estévez 等^[57]认为, 饮食中增加的 AA 含量对色素沉积有负面影响。McEvoy 等^[58]、Copeman 等^[59]、Bell 等^[60]的研究均表明, 高 AA 水平与各种比目鱼的色素沉着有关^[58-60]。Willey 等^[61]用富含 AA 的轮虫(*Rotifer*)和卤虫(*Artemia*)喂养大西洋牙鲆(*Paralichthys dentatus*), 发现增加 AA 饲料和色素沉着发生率存在剂量依赖效应。Villalta 等^[62]改变了塞内加尔舌鲷(*Cynoglossus senegalensis*)日粮中 AA 的含量, 发现随着 AA 的增多伴随着 PG 含量的升高, 并且 PG 含量与色素沉着存在着紧密的相关性。Lund 等^[63]在欧洲鲷(*Solea solea*)中发现, 体色异常只与 AA 的绝对量相关, 而与 AA 和其他多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated Fatty Acid, PUFA)的比例无关。Bogolino 等^[64]研究发现, PGE2 在塞内加尔舌鲷中也引起了体色异常的结果。以上研究都表明 AA 的变化会影响比目鱼类体色素沉着。导致 AA 诱导比目鱼色素沉着的确切机制尚不清楚, 但已存在 3 种假说: 第一, 改变饲料中 AA 含量可能导致神经组织膜的次生化组成, 而神经组织参与控制变态、黑色素合成和色素团分化^[57]; 第二, AA 衍生的二十碳五烯酸的过量产生会导致鱼类经历非生物化学诱导的应激, 从而导致色素失调^[55]; 第三, 酪氨酸酶的合成和降解是调节色素沉着所必需的, 饮食中 n-6 多不饱和脂肪酸可以改变酪氨酸酶的合成和降解^[65]。有研究将正常体色个体与由 AA 修饰引起的变色日本牙鲆进行对比研究, 发现黑素皮质激素(α -黑素细胞刺激激素 α -MSH 和肾上腺皮质激素 ACTH)在色素形成过程中起重要作用^[66]。而 MSH 的作用主要为激活酪氨酸酶, 并促进酪氨酸酶合成, 从而促进黑色素合成, 使皮肤颜色加深。

本研究筛选出半滑舌鳎体色异常相关的5个差异基因, 其中 *alox15b*、*ptgs2* 可以将AA转变或者使其代谢为其他物质, 从而改变半滑舌鳎中AA的含量。而 *ptgis* 不仅是AA的主要产物, 还是CYP450中的成员, 饲料中营养素对鱼类体色的影响主要就是通过鱼体

色素细胞或色素体起作用的。因此, 本文推测 *alox15b*、*ptgs2*、*ptgis* 基因是通过影响AA进而影响了半滑舌鳎无眼侧体色的色素沉积。本研究为半滑舌鳎无眼侧体色异常的进一步研究提供了分子线索, 关于AA影响鱼类体色异常的分子机制仍有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Odiome J M. Degeneration of Melanophores in fundulus[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1933, 19(3): 329–332.
- [2] Odiome J M. Morphological color changes in vertebrates[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1948, 4: 288–308.
- [3] Sugimoto M. Morphological color changes in fish: regulation of pigment cell density and morphology[J]. *Microscopy Research & Technique*, 2002, 58(6): 496–503.
- [4] 刘翠, 刘昊昆, 朱晓鸣, 等. 饲料中添加螺旋藻和叶黄素对杂交黄颡鱼生长、抗氧化能力和体色异常调控的比较研究[J]. *水生生物学报*, 2021, 45(5): 1024–1033.
Liu Cui, Liu Haokun, Zhu Xiaoming, et al. Comparative study on the regulation of growth, antioxidant capacity and abnormal body color of hybrid *Pelteobagrus fulvidraco* by adding *Spirulina* and lutein in feed[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, 45(5): 1024–1033.
- [5] Sugimoto M, Uchida N, Hatayama M. Apoptosis in skin pigment cells of the medaka, *Oryzias latipes* (Teleostei), during long-term chromatic adaptation: the role of sympathetic innervation[J]. *Cell and Tissue Research*, 2000, 301(2): 205–216.
- [6] Hamre K, Holen E, Moren M. Pigmentation and eye migration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae: new findings and hypotheses[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2007, 13(1): 65–80.
- [7] Youngson A F, Webb J H. Thyroid hormone levels in Atlantic salmon (*Salmo salar*) during the return migration from the ocean to spawn[J]. *Journal of Fish Biology*, 1993, 42(2): 293–300.
- [8] Vissio P G, Darias M J, Di Yorio M P, et al. Fish skin pigmentation in aquaculture: the influence of rearing conditions and its neuroendocrine regulation[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2021, 301: 113662.
- [9] 曹小龙. 斑马鱼报警物质和色素模式对其行为影响的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
Cao Xiaolong. Effects of alarm substances and pigment patterns on behavior of zebrafish (*Danio rerio*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019.
- [10] 邓成, 陈帅龙, 叶恒振, 等. 体色差异豹纹鳃棘鲈的色素及酶含量分析[J]. *生命科学研究*, 2020, 24(1): 15–20.
Deng Cheng, Chen Shuailong, Ye Hengzhen, et al. Analysis of pigment and enzyme levels of *Plectropomus leopardus* with body color difference[J]. *Life Science Research*, 2020, 24(1): 15–20.
- [11] 于道德, 张少春, 宋静静, 等. 鱼类色素细胞及其生态学意义概述[J]. *广西科学院学报*, 2020, 36(2): 117–123.
Yu Daode, Zhang Shaochun, Song Jingjing, et al. Overview of fish pigment cells and the ecological significance[J]. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2020, 36(2): 117–123.
- [12] 史学营, 徐永江, 武宁宁, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)体表色素细胞观察及POMC表达特性分析[J]. *渔业科学进展*, 2015, 36(2): 45–54.
Shi Xueying, Xu Yongjiang, Wu Ningning, et al. Preliminary studies on blind-side hypermelanosis of *Cynoglossus semilaevis*: chromatophores observation and expression of proopiomelanocortin[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(2): 45–54.
- [13] 许细丹. 酪氨酸酶对瓯江彩鲤和斑马鱼黑斑体色影响的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.
Xu Xidan. Study on the effect of tyrosinase on black coloration in Oujiang color common carp and zebrafish[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020.
- [14] 许璟瑾, 张文娟, 王静怡, 等. 金线莲抑制斑马鱼黑色素形成的活性组分筛选及机理研究[J]. *遗传*, 2017, 39(12): 1178–1187.
Xu Jingjin, Zhang Wenjuan, Wang Jingyi, et al. The active component screening of *Anoectochilus roxburghii* and the functional study on inhibition of melanogenesis in zebrafish[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2017, 39(12): 1178–1187.
- [15] 刘力, 裴思然, 吴华丽, 等. 基于 *tyrp1a* 转基因斑马鱼构建色素障碍性疾病药物筛选模型[J]. *中国药科大学学报*, 2016, 47(6): 740–743.
Liu Li, Pei Siran, Wu Huali, et al. Drug screening model of treating pigmentation disorders in *tyrp1a* transgenic zebrafish[J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2016, 47(6): 740–743.
- [16] Lamason R L, Mohideen M P K, Mest J R, et al. SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans[J]. *Science*, 2005, 310(5755): 1782–1786.
- [17] 赵美娟, 户晶晶, 倪辉, 等. 黑色素生成信号通路研究进展[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(9): 1633–1642.
Zhao Meijuan, Hu Jingjing, Ni Hui, et al. Research progress in melanogenesis signaling pathway[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(9): 1633–1642.
- [18] 芮孝. 鲤、鲫复制Sox10基因的表达和功能分化研究[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2018.

- Rui Xiao. Expression and functional differentiation of duplicated Sox10 genes in common carp and crucian carp[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2018.
- [19] 吴垚磊, 李仰真, 王娜, 等. 半滑舌鳎酪氨酸酶基因(TYR)和多巴色素异构酶基因(DCT)的克隆表达与分析[J]. 渔业科学进展, 2021, 42(6): 42–52.
- Wu Yaolei, Li Yangzhen, Wang Na, et al. Expression analysis of TYR and DCT genes related to body color in *Cynoglossus semilaevis* at different periods and in different tissues[J]. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(6): 42–52.
- [20] 傅建军, 朱文彬, 罗文韬, 等. 不同体色鲤的生长、酪氨酸酶活性、黑色素含量及基因表达比较[J]. 中国水产科学, 2021, 28(8): 919–947.
- Fu Jianjun, Zhu Wenbin, Luo Wentao, et al. Comparison of growth, tyrosinase activity, melanin content, and gene expression between common carps with different pigmentations[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2021, 28(8): 919–947.
- [21] 孟超, 徐皓, 黄超, 等. 鱼类体色相关功能基因的研究进展[J]. 湖南文理学院学报(自然科学版), 2020, 32(3): 30–35.
- Meng Chao, Xu Hao, Huang Chao, et al. Research progress on color-related genes of fish[J]. Journal of Hunan University of Arts and Science (Science and Technology), 2020, 32(3): 30–35.
- [22] Cal L, Suarez-Bregua P, Cerdá-Reverter J M, et al. Fish pigmentation and the melanocortin system[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2017, 211: 26–33.
- [23] Shelbourne J E. Population effects on the survival, growth and pigment of tank-reared plaice larvae[M]//Harden Jones F R. Sea Fisheries Research. London: Elsk, 1974: 729–735.
- [24] Seikai T, Matsumoto J. Mechanism of Pseudoalbinism in flatfish: an association between pigment cell and skin differentiation[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 1994, 25(1): 78–85.
- [25] Tabata K. Application of the chromosomal manipulation in aquaculture of hirame *Paralichthys olivaceus*[J]. Bulletin of Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station, 1991, 28: 1–134.
- [26] Nakamura K, Iida H, Nakano H. Riboflavin in the skin of Albinic flatfish *Liopsetta obscura*[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1986, 52(12): 2207.
- [27] Kanazawa A. Nutritional mechanisms involved in the occurrence of abnormal pigmentation in hatchery-reared flatfish[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 1993, 24(2): 162–166.
- [28] Devresse B, Léger P, Sorgeloos P, et al. Improvement of flat fish pigmentation through the use of DHA-enriched rotifers and *Artemia*[J]. Aquaculture, 1994, 124(1/4): 287–288.
- [29] Shao Changwei, Bao Baolong, Xie Zhiyuan, et al. The genome and transcriptome of Japanese flounder provide insights into flatfish asymmetry[J]. Nature Genetics, 2017, 49(1): 119–124.
- [30] Paterson E K, Ho H, Kapadia R, et al. 9-cis retinoic acid is the ALDH1A1 product that stimulates melanogenesis[J]. Experimental Dermatology, 2013, 22(3): 202–209.
- [31] Takahashi A, Kosugi T, Kobayashi Y, et al. The melanin-concentrating hormone receptor 2 (MCH-R2) mediates the effect of MCH to control body color for background adaptation in the barfin flounder[J]. General and Comparative Endocrinology, 2007, 151(2): 210–219.
- [32] 朱学武, 徐永江, 柳学周, 等. 池塘养殖牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)无眼侧体色黑化消褪机理[J]. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 103–110.
- Zhu Xuewu, Xu Yongjiang, Liu Xuezhou, et al. Physiological mechanisms for degeneration of blind-side Hypermelanosis in pond-cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(1): 103–110.
- [33] Koga A, Inagaki H, Bessho Y, et al. Insertion of a novel transposable element in the tyrosinase gene is responsible for an albino mutation in the medaka fish, *Oryzias latipes*[J]. Molecular and General Genetics MGG, 1995, 249: 400–405.
- [34] Boonanuntanasarn S, Yoshizaki G, Iwai K, et al. Molecular cloning, gene expression in albino mutants and gene knockdown studies of tyrosinase mRNA in rainbow trout[J]. Pigment Cell Research, 2004, 17(4): 413–421.
- [35] Zhang X T, Weik J, Chen, Y Y, et al. Molecular cloning and expression analysis of tyr and tyrp1 genes in normal and albino yellow catfish *Tachysurus fulvidraco*[J]. Journal of Fish Biology, 2018, 92: 979–998.
- [36] 史学营, 柳学周, 石莹, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)黑色素聚集素受体 (*MCHR*)表达特性及其与无眼侧黑化的关系[J]. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 91–102.
- Shi Xueying, Liu Xuezhou, Shi Ying, et al. Molecular characterization of *MCHR* and its correlation with blind-side Hypermelanosis in *Cynoglossus semilaevis*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(1): 91–102.
- [37] 邱超达. SWS1介导的紫光/紫外光对斑马鱼皮肤黑色素细胞形成的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.
- Qiu Chaoda. The influence of SWS1 mediated violet/ultra violet on the formation of cutaneous melanocyte cells in zebrafish[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020.
- [38] Li Kunming, Zhao Na, Zhang Bo, et al. Identification and characterization of the melanocortin 1 receptor gene (MC1R) in hypermelanistic Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2020, 46(3): 881–890.
- [39] Li Yangzhen, Hu Yuanri, Zheng Weiwei, et al. Insights into the heritable variation of hypermelanosis in Chinese tongue sole (*Cynoglossus halfilaevis*): potential for future selective breeding[J]. Aquaculture, 2021, 539: 736617.
- [40] 朱学武, 徐永江, 柳学周, 等. 半滑舌鳎黑色素聚集素重组制备与生物活性分析[J]. 水产学报, 2016, 40(10): 1595–1605.

- Zhu Xuewu, Xu Yongjiang, Liu Xuezhou, et al. *In vitro* expression and bioactivity analysis of melanin concentration hormone from *Cynoglossus semilaevis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(10): 1595–1605.
- [41] 史学营. 养殖半滑舌鳎无眼侧黑化机制的初步研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
Shi Xueying. Preliminary investigation on mechanism for blind-side hypermelanosis of farmed tongue sole[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015.
- [42] 马学坤, 柳学周, 温海深, 等. 半滑舌鳎早期发育过程中体表色素变化的研究[J]. 海洋水产研究, 2006, 27(2): 62–68.
Ma Xuekun, Liu Xuezhou, Wen Haishen, et al. Changes of melanophores in the larval skin of *Cynoglossus semilaevis* Günther[J]. Marine Fisheries Research, 2006, 27(2): 62–68.
- [43] 朱学武. 养殖鲆鲽类无眼侧黑化调控机制研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
Zhu Xuewu. Studies on regulation mechanisms underline blind-side hypermelanosis of farmed flatfish[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016.
- [44] Zhang Lin, Hou Yanhong, Li Nan, et al. The influence of TXNDC5 gene on gastric cancer cell[J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2010, 136(10): 1497–1505.
- [45] Vincent E E, Elder D J E, Phillips L, et al. Overexpression of the TXNDC5 protein in non-small cell lung carcinoma[J]. Anticancer Research, 2011, 31(5): 1577–1582.
- [46] Ivanov I, Kuhn H, Heydeck D. Structural and functional biology of arachidonic acid 15-lipoxygenase-1 (ALOX15)[J]. Gene, 2015, 573(1): 1–32.
- [47] Kutzner L, Goloshchapova K, Heydeck D, et al. Mammalian ALOX15 orthologs exhibit pronounced dual positional specificity with docosahexaenoic acid[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2017, 1862(7): 666–675.
- [48] Sirois J, Sayasith K, Brown K A, et al. Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account[J]. Human Reproduction Update, 2004, 10(5): 373–385.
- [49] Shrestha K, Lukasik K, Baufeld A, et al. Regulation of ovulatory genes in bovine granulosa cells: lessons from siRNA silencing of *PTGS2*[J]. Reproduction, 2015, 149(1): 21–29.
- [50] Lim H, Gupta R A, Ma Wenge, et al. Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPAR δ [J]. Genes & Development, 1999, 13(12): 1561–1574.
- [51] Nakayama T, Soma M, Izumi Y, et al. Organization of the human prostacyclin synthase gene[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996, 221(3): 803–806.
- [52] 曾小芳. PTGIS基因突变对肺血管内皮细胞功能的影响[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2018.
Zeng Xiaofang. Effect of PTGIS gene mutation on the function of pulmonary vascular endothelial cells[D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2018.
- [53] De Fusco M, Marconi R, Silvestri L, et al. Haploinsufficiency of *ATP1A2* encoding the Na⁺/K⁺ pump α 2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2[J]. Nature Genetics, 2003, 33(2): 192–196.
- [54] Bruce M, Oyen F, Bell G, et al. Development of broodstock diets for the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) with special emphasis on the importance of *n*-3 and *n*-6 highly unsaturated fatty acid to reproductive performance[J]. Aquaculture, 1999, 177(1/4): 85–97.
- [55] Sargent J, McEvoy L, Estevez A, et al. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions[J]. Aquaculture, 1999, 179(1/4): 217–229.
- [56] Van Anholt R D, Koven W M, Lutzky S, et al. Dietary supplementation with arachidonic acid alters the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae[J]. Aquaculture, 2004, 238(1/4): 369–383.
- [57] Estévez A, McEvoy L A, Bell J G, et al. Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed live-prey enriched in Arachidonic and Eicosapentaenoic acids[J]. Aquaculture, 1999, 180(3/4): 321–343.
- [58] McEvoy L A, Estévez A, Bell J G, et al. Influence of dietary levels of eicosapentaenoic and arachidonic acids on the pigmentation success of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.)[J]. Bulletin of the Aquaculture Association of Canada, 1999(98-4): 17–20.
- [59] Copeman L A, Parrish C C, Brown J A, et al. Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment[J]. Aquaculture, 2002, 210(1/4): 285–304.
- [60] Bell J G, McEvoy L A, Estevez A, et al. Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae[J]. Aquaculture, 2003, 227(1/4): 211–220.
- [61] Willey S, Bengtson D A, Harel M. Arachidonic acid requirements in larval summer flounder, *Paralichthys dentatus*[J]. Aquaculture International, 2003, 11(1): 131–149.
- [62] Villalta M, Estévez A, Bransden M P, et al. Arachidonic acid, arachidonic/eicosapentaenoic acid ratio, stearidonic acid and eicosanoids are involved in dietary-induced albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*) [J]. Aquaculture Nutrition, 2008, 14(2): 120–128.
- [63] Lund I, Steinfeldt S J, C B W. Effect of dietary arachidonic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on survival, growth and pigmentation in larvae of common sole (*Solea solea* L.) [J]. Aquaculture, 2007, 273(4): 532–544.
- [64] Boglino A, Wishkerman A, Darias M J, et al. The effects of dietary arachidonic acid on Senegalese sole morphogenesis: a synthesis of re-

- cent findings[J]. *Aquaculture*, 2014, 432: 443-452.
- [65] Ando H, Watabe H, Valencia J C, et al. Fatty acids regulate pigmentation via proteasomal degradation of tyrosinase: a new aspect of ubiquitin-proteasome function[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(15): 15427-15433.
- [66] Estevez A, Kaneko T, Seikai T, et al. Ontogeny of ACTH and MSH cells in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) in relation to albinism[J]. *Aquaculture*, 2001, 202(1/2): 131-143.

Identification of genes related to blind side hypermelanosis of *Cynoglossus semilaevis* based on skin transcriptome sequencing

Zhao Na^{1,3}, He Xiaoxu^{2,4}, Jia Lei², Zhu Chunhua¹, Zhang Bo^{1,2}

(1. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China; 2. Tianjin Fisheries Research Institute, Tianjin 300457, China; 3. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: *Cynoglossus semilaevis* as a representative species of Pleuronectiformes, is an important marine economic fish in Chinese coastal areas. The abnormal body color of *C. semilaevis* has been perplexing the practitioners for a long time. There are many reasons leading to abnormal body color, among which the genetic factors are thought to be the most fundamental reasons. The present researches on hypermelanosis of the blind side of *C. semilaevis* mainly focus on environment, nutrition, physiology, cloning of known pigmental genes and so on, while the digging of new functional genes is still lacking. In this study, skin samples with different colors of *C. semilaevis* are selected for transcriptome sequencing. Through GO and KEGG functional enrichment and comparative analysis of different genes, differential expressed genes are screened in six melanogenesis-related KEGG pathways and the top ten genes are verified by qPCR. In this study, we find five functional genes with significant changes in the hypermelanotic skin on the blind side of *C. semilaevis*, which refer to *txndc*, *alox15b*, *ptgs2*, *ptgis*, and *atpla2a* ($p < 0.05$). The expression levels of *txndc*, *alox15b*, *ptgs2*, and *ptgis* genes in the melanization group are higher than those in the control group. In terms of function, three of these five genes are related to arachidonic acid (AA) to some extent. This provides theoretical support for the hypothesis that nutritional regulation related to unsaturated fatty acids may be involved in the molecular mechanism of abnormal body color in *C. semilaevis*.

Key words: skin; *Cynoglossus semilaevis*; hypermelanosis; arachidonic acid; transcriptome